

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 63-014788

(43)Date of publication of application : 21.01.1988

(51)Int.Cl.

C07F 9/10
A61K 31/66
A61K 31/685

(21)Application number : 61-155033

(71)Applicant : MEIJI MILK PROD CO LTD

(22)Date of filing : 03.07.1986

(72)Inventor : HIRASAWA KEISUKE
MURAKAMI MICHIO
SATO YOSHIRO(54) NOVEL DIOXETHENYL PHOSPHATIDIC ACID DERIVATIVE AND CARCINOSTATIC AGENT
CONTAINING SAID COMPOUND AS ACTIVE INGREDIENT

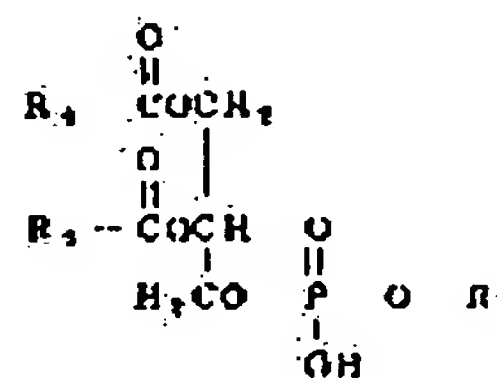
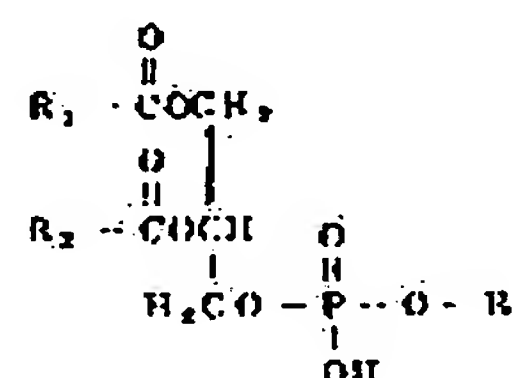
(57)Abstract:

NEW MATERIAL: A compound expressed by formula I (at least one of R₁ and R₂ represents 7W21C hydrocarbonyl group containing at least one dioxethenyl group in the structure thereof, and the rest represents 7W21C hydrocarbon group; R₃ represents serine residue, inositol residue, glycerol residue, choline residue or aminoethyl).

EXAMPLE: Dioxethenyl-soybean-phosphatidylcholine.

USE: A carcinostatic agent.

PREPARATION: For example, a phosphatidic acid derivative expressed by formula II (example; phosphatidylserine, etc.) is subjected under an action of ozone in a ketone solvent, etc., to form a dioxethenated derivative.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the
examiner's decision of rejection or application
converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of
rejection][Date of requesting appeal against examiner's
decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Best Available Copy

⑬ Int.Cl.⁴

C 07 F 9/10
A 61 K 31/66
31/685

識別記号

A D U

庁内整理番号

6917-4H

⑭ 公開 昭和63年(1988)1月21日

審査請求 未請求 発明の数 2 (全8頁)

⑮ 発明の名称 新規なジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体およびそれを有効成分とする制癌剤

⑯ 特 願 昭61-155033

⑰ 出 願 昭61(1986)7月3日

⑱ 発 明 者 平 澤 計 介 神奈川県小田原市荻窪464 田中ハイツ202
⑱ 発 明 者 村 上 道 男 神奈川県小田原市曾比1604の2 剣持ハイツ105
⑱ 発 明 者 佐 藤 吉 朗 神奈川県小田原市南鴨宮2の49の9 サンハイツ203
⑲ 出 願 人 明治乳業株式会社 東京都中央区京橋2丁目3番6号
⑳ 代 理 人 弁理士 有賀 三幸 外2名

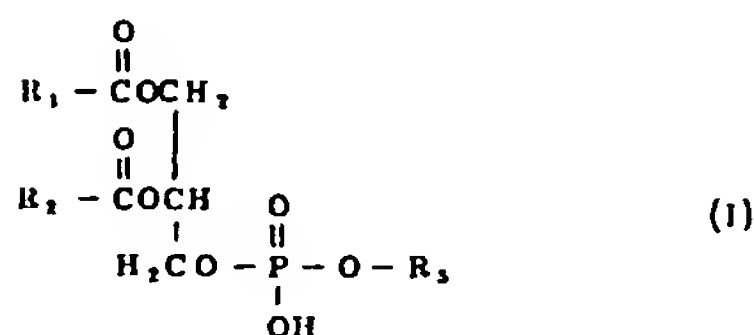
明 細 書

1. 発明の名称

新規なジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体およびそれを有効成分とする制癌剤

2. 特許請求の範囲

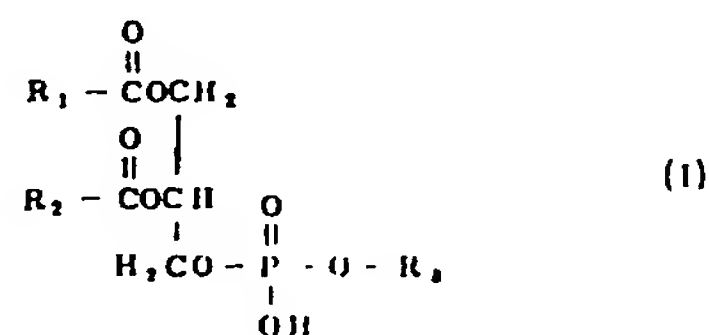
1. 次の一般式(I)



(式中、R₁ 及び R₂ の少なくとも一方は、構造中に少なくとも1個のジオキセタン基を含む炭素数7～21の炭化水素基を示し、残余は炭素数7～21の飽和もしくは不飽和の炭化水素基を示す。R₃ は水素原子、セリン残

基、イノシトール残基、グリセロール残基、コリン残基、又はアミノエチル基を示す)で表されるジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体。

2. 次の一般式(II)



(式中、R₁ 及び R₂ の少なくとも一方は、構造中に少なくとも1個のジオキセタン基を含む炭素数7～21の炭化水素基を示し、残余は炭素数7～21の飽和もしくは不飽和の炭化水素基を示す。R₃ は水素原子、セリン残基、イノシトール残基、グリセロール残基、

コリン残基、又はアミノエチル基を示す)

で表されるジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体を有効成分とする制癌剤。

3. ジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体のリポソームである特許請求の範囲第2項記載の制癌剤。

3. 発明の詳細な説明

(産業上の利用分野)

本発明は新規な制癌剤に関する。更に詳しくは、ホスファチジン酸誘導体のホスファチジン酸残基中のシアシルグリセロール部分にある2つのアシル基のどちらか一方もしくは両方に少なくとも1つのジオキセタン基を導入した新規なジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体およびそれを有効成分とする制癌剤

- 3 -

(cyclophosphamide)、ビンクリスチン(vincristine)、或いは免疫療法剤、例えばクレスチン、ピシバニールなどが発明され、临床上多大な貢献をなしている。しかしながらこれらの薬剤も、化学療法剤に於いては重篤な副作用が、また免疫療法剤に於いては効果の面に難点が少なくなく、未だに決定的な制癌剤は見出されているとはいえないものである。

一方、ホスファチジン酸誘導体、特にホスファチジルコリン、ホスファチジルセリン、ホスファチジルエタノールアミンはバクテリアから高等動植物に至るまで生物界に広く見出される物質である。

その薬剤としての使用は、呼吸窮迫症候群

に関する。

(従来の技術)

癌は今や日本人の死亡原因の第一位となり、この状況は主要先進国に於いても同様であつて、その制癌は人類全体の悲願とも言えるものである。現在のところ外科的な治療が主力であるが、これを補完、もしくは代替するための薬剤の開発に向けて、世界各国の数多くの研究者が長年の間莫大な努力を傾けてきた。その結果として様々な化学療法剤、例えばマイトマイシンC(mitomycin C)、ブレオマイシン(bleomycin)、5-FU(5-fluorouracil)、アドリアマイシン(adriamycin)、メトトレキセート(methotrexate)、シクロフオスファミド

- 4 -

の治療のための肺表面活性剤(特開昭59-95219、西独特許公開3,229,179など)、老化に伴う記憶障害の治療剤(アメリカ特許4,385,053)脳卒中による意識混濁の治療剤(特開昭55-115824)等が知られている。しかしながら、制癌剤としての用途は知られていない。

ホスファチジン酸誘導体の腫瘍細胞に対する作用については、「バイオケミカル・アンド・バイオフィジカル・リサーチ・コミュニケーションズ」(Biochemical and Biophysical Research Communications)、第114巻、第2号、863-871頁(1983年)において、ジエットら(Jettl.M, et al.)による、植物由来のホスファチジンセリンのリポソ-

ムが腫瘍細胞特異的な細胞障害性を示し、正常細胞には何ら細胞障害性を示さないという報告がある。そして彼らは同論文中で動物由来のホスファチジルセリンのリポソームにはこのような効果は認められなかつたと記している。また彼らは、植物由来のホスファチジリンノシトールのみが癌細胞殺に殺細胞効果を示したことからアラキドン酸欠如がもたらしたものと推定している。本発明者らも同様な実験を行つたが必ずしも同様な結果を常に得ることができなかつた。

〔発明が解決しようとする問題点〕

本発明者らも癌制圧の課題の解決に向けて様々な確度から取り組んできたが、その一環として上述したジェットらの報告等を参考に

してホスファチジン酸誘導体の腫瘍細胞特異的な細胞障害性に注目し、ジェットらの報告とは異なる結果、即ち、哺乳動物由来のホスファチジルセリン（以下PSと言う）またはホスファチジリンノシトール（以下、PIと言う）が *in vitro* で腫瘍細胞特異的に殺細胞作用を示し、また、*in vivo* では担癌マウスの平均寿命を延長せしめる制癌作用を示すことを明らかにした。しかしながらPS、PIの該作用はサンプルによるばらつきがあり、安定した制癌作用の本体は明らかではなかつた。

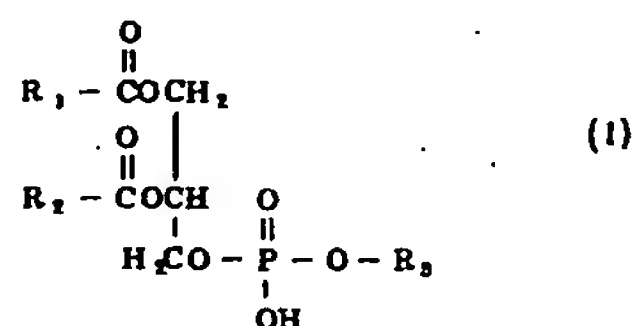
〔問題点を解決するための手段〕

かかる実情において、本発明者は、ホスファチジン酸誘導体の制癌効果について更に研

- 7 -

究を行つていたところ、ホスファチジン酸誘導体のシアシルグリセロールを構成するアシル基の不飽和結合（二重結合）をジオキセタン化したものが優れた制癌作用を有することを見出し、本発明を完成した。

すなわち、本発明は、次の一般式(I)



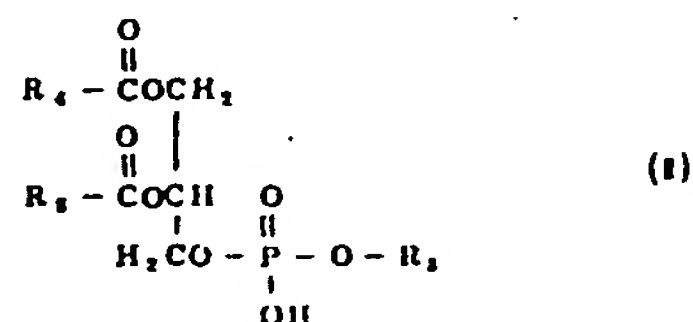
（式中、 R_1 及び R_2 の少なくとも一方は、構造中に少なくとも1個のジオキセタン基を含む炭素数7～21の炭化水素基を示し、残余は炭素数7～21の飽和もしくは不飽和の炭化水素基を示す。 R_3 は水素原子、セリン残

- 8 -

基、イノシトール残基、グリセロール残基、コリン残基又はアミノエチル基を示す）で表されるジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体およびそれを有効成分とする制癌剤を提供するものである。

本発明におけるジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体には種々の立体異性体が存在するが、何れも優れた制癌作用を有するので、これらは全て本発明に包含される。

本発明のジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体(II)は、例えば、次の一般式(II)、



(式中、 R_1 及び R_2 の少なくとも一方は炭素数 7 ~ 21 の不飽和炭化水素基を示し、残余は炭素数 7 ~ 21 の飽和もしくは不飽和の炭化水素基を示す。 R_3 は前記と同じものを示す)

で表されるホスファチジン酸誘導体をジオキセタン化することにより製造される。

本発明において、(I)式で表されるホスファチジン酸誘導体としては次のものが挙げられる。

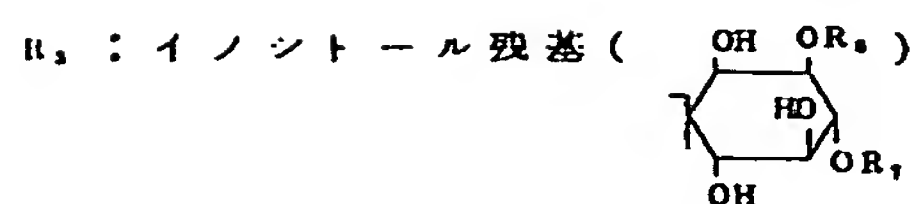
ホスファチジン酸 (以下、PA と言う)

R_1 : 水素原子

ホスファチジルセリン (PS)

R_1 : セリン残基 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{NH}_2)\text{COOH}$)

ホスファチジリンイノシトール ($R_1=R_2=\text{H}$; PI)



(R_4, R_7 は水素原子又は $-\text{PO}_3\text{H}_2$)

ホスファチジルグリセロール (以下、PG と言う)

R_1 : グリセロール残基 ($-\text{CH}_2\text{CH}(\text{OH})\text{CH}_2\text{OH}$)

ホスファチジルコリン (以下、PC と言う)

R_1 : コリン残基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$)

ホスファチジリエタノールアミン (以下、PE と言う)

R_1 : アミノエチル基 ($-\text{CH}_2\text{CH}_2\text{NH}_2$)

これらのホスファチジン酸誘導体は何れも公知の化合物であり、大豆、哺乳動物、酵母等の天然物から分離するか、あるいは合成によつて入手することができる。

- 11 -

本発明方法において、ホスファチジン酸誘導体(I)をジオキセタン化する方法は、自体公知の方法、例えば、J. Am. Chem. Soc., 94, 2143 (1972)に記載の方法に従つて、ケトン溶媒中でオゾンを作用させる方法が採用される。

本発明化合物(I)において、ジオキセタン基は、2つのアシル基の少なくとも一方に1個以上存在すればよく、又その位置も問わないが、ジオキセタン基の数が多の方が制癌効果が強い。

本発明制癌剤はジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体(I)をリポソームの形にするのが好ましい。ジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体は両親媒制 (amphipathic) であるの

- 12 -

で、それ単独でもリポソームを形成することができるが、安定化剤としてコレステロールを使用することもできる。

本発明の制癌剤をヒトに投与するには、癌の原発部位、手術後の癌摘出部位などの局所組織内、あるいは皮下、皮内、皮下、筋肉内、静脈、経口などによつて投与される。投与量は投与方法と癌の悪性度、癌の種類、患者の症状及び癌の進行度などによつて異なってくるが、例えば1日に10 ~ 1000 mg/kgを週1 ~ 2回、或いは連日投与するのが好ましい。

(実施例)

次に実施例を挙げて説明する。

実施例 1

ジオキセタン化大豆ホスファチジルコリン

(C-大豆PC)の製造:

大豆ホスファチジルコリン2g(Nu-Check社)を200mlの2-ペンタノン溶液としてボトルの中に入れ、まわりをドライアイスアセトンで-80℃として、オゾンを通気した。10分間通気後、ボトル中の2-ペンタノンをエバポレーターで減圧留去する。得られた粘稠液体をシリカゲルカラム(Merck社)にアプライシクロロホルム中のメタノール濃度を徐々に増すグラジエント溶出を行い、クロロホルム中メタノール40%分画よりC-大豆PCを0.9g得た。

実施例2

ジオキセタン化大豆ホスファチジルイノシトール(C-大豆PI)の製造:

-15-

シルコリンの製造:

① 1L容量ナスフラスコに粗精製(ホスファチジルコリン) (Nu-Check社)を無水エーテルに溶解させたものと、社50gテトラブチルアンモニウムヒドロキシルド(25%メタノール溶液, Aldrich社)50mlを加え栓をし2分間振った。5~10分後、溶液は濁り沈殿が生じた。上澄み液をピペットで吸い取り、ついで沈殿に125mlのメタノールを加え煮沸させた。

その後、Hyflo-Super-Gel(Merck社)1gを加え熱いうちに吸引ろ過した。ろ液を冷却し無水エーテル250mlを加え沈殿を析出させ、上清をデカンテーションで取り除いた。この沈殿にCdCl₂溶液(CdCl₂·2H₂O 16g/40ml水)を煮沸させてから加え、軽く攪拌し、更にエタノール250mlを加え、

大豆ホスファチジルイノシトール2g

(Nu-Check社)を200mlの2-ペンタノン溶液としてボトルの中に入れ、まわりをドライアイスアセトンで-80℃として、オゾンを通気した。10分間通気後、ボトル中の2-ペンタノンをエバポレーターで減圧留去する。得られた粘稠液体をシリカゲルカラム(Merck社)にアプライシクロロホルム中のメタノール濃度を徐々に増すグラジエント溶出を行い、クロロホルム中メタノール25%分画よりC-大豆PIを0.8g得た。得られたC-大豆PIについてNMR分析を行い、構造を確認した。結果を第1図に示す。

実施例3

ジオキセタン化シリノレイン酸ホスファチ

-16-

4℃で一晩放置した。結晶を析出させ、上清をデカンテーションで除き、結晶を乾燥して、グリセリルホスホリルコリン-3CdCl₂複合体(以下、L-α-GPC-CdCl₂と称する)の結晶20gを得た。

② 冷却装置付1Lナスフラスコにリノレイン酸(半井化学社)100gと塩化チオニル(半井化学)171gを入れ、温浴(ウォーターバス)中で2時間遊流し反応させた。反応終了後ウォーターバスの温度を40℃まで下げ、冷却装置をフラスコよりはずし、上部開口部をサツカーにつなぎ減圧下で未反応の塩化チオニルを留去した。塩化チオニルを除いた後、反応液を減圧蒸留しリノレイン酸クロライド71.2gを得た。

③ 500 ml 容量三つ口フラスコに 100 ml ガラスビーズ (φ 5 mm) と 11 g の L-α-GPC-CdCl₂ を入れ、氷冷しながら微しく攪拌し L-α-GPC-CdCl₂ を粉砕した。ついで 59.4 g リノレイン酸クロライドの無水クロロホルム溶液 60 ml を徐々に加え、更に無水ピリジン 11 ml、無水クロロホルム 100 ml の混合液を添加し、0℃で30分間、室温で2時間反応させた。反応終了後、反応液をプフナーろ過装置を通してガラスビーズを除去した後、反応液に 100 ml メタノールをゆつくり加え、更に 100 ml 2.5% 食塩水を加え相分離を行なった。クロロホルム相を濃縮し合成 L-α-ジリノレノイルホスファチジルコリン (以下、合成ジリノレイン酸 PC と称す) を得た。

- 19 -

同様な方法で純度 99% 以上のジオキセタン化ジリノール酸 PC (以下 C-ジリノール酸 PC と称す) も得た。

実施例 4

リポソームの製造:

実施例 1～3 で得たジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体 (C-大豆 PC、C-大豆 PI、C-ジリノレイン酸 PC) 100 ㎍ をクロロホルム 10 ml に溶解し、更に 1.5 ml のクロロホルム/メタノール/0.5 M KOH = 75/25/2 (v/v/v) の混合液を加えて良く混合した。試験管壁にジオキセタン化ホスファチジン酸誘導体を付着させるように試験管を回しつつ、窒素ガスを吹き付けながら乾燥させる。そこで組織培養に於いて通常用い

④ こうして得た合成ジリノレイン酸 PC 2 g を 200 ml の 2-ペンタノン溶液とし、ボトルに入れ、まわりをドライアイスアセトンで -80℃ としオゾンを通気し反応させた。反応終了後、2-ペンタノンをエバポレーターで減圧留去し、得られた粘稠液体をシリカゲルカラム (Morch 社) にアプライシクロロホルム中のメタノールを徐々に増しながら溶出するグラジエント溶出で精製しクロロホルム中メタノール 40% 分画よりジオキセタン化 L-α-ジリノレノイルホスファチジルコリン (以下 C-ジリノレイン酸 PC と称す) を 1.1 g 得た。得られた C-ジリノレイン酸 PC は、すべての不飽和結合がジオキセタン化していた。

- 20 -

られている組織培養液、例えば RPMI 1640、MEM などを加えて素早くボルテックス・ミキサーにてよく攪拌して C-大豆 PC、C-大豆 PI、C-ジリノレイン酸 PC の各リポソームを得た。

実施例 5

一群 6 匹 (オス、5 週令、体重 23 ± 1 g) の CDF1 マウスの腹腔内に白血病系腹水癌 L-1210 細胞 10⁸ 個を移植した。移植 24 時間後より 1、3、5 及び 7 日の 4 回実施例 4 で調製した各リポソームを第 1 表に示す量で腹腔内投与し、下記式に基いて延命率を求めた。

$$\text{延命率 (ILS \%)} = \frac{T - C}{C} \times 100$$

- 21 -

- 716 -

- 22 -

T : リボソーム投与群の平均生存日数

C : コントロール群の平均生存日数

その結果を第1表に示す。

以下余白

第1表

リボソーム	投与量 (mg/kg/日)	延命率 (%)
大豆PCリボソーム(比較)	220	0
C-大豆PCリボソーム(本発明)	220	31.5
大豆PIリボソーム(比較)	220	2.5
C-大豆PIリボソーム(本発明)	220	33.5
ジリノール酸PCリボソーム(比較)	100	0
C-ジリノール酸PCリボソーム(本発明)	100	40.5
ジリノレイン酸PCリボソーム(比較)	100	0
C-ジリノレイン酸PCリボソーム(本発明)	100	49.5

- 24 -

- 23 -

4. 図面の簡単な説明

第1図はC-大豆PIのNMRスペクトルである。

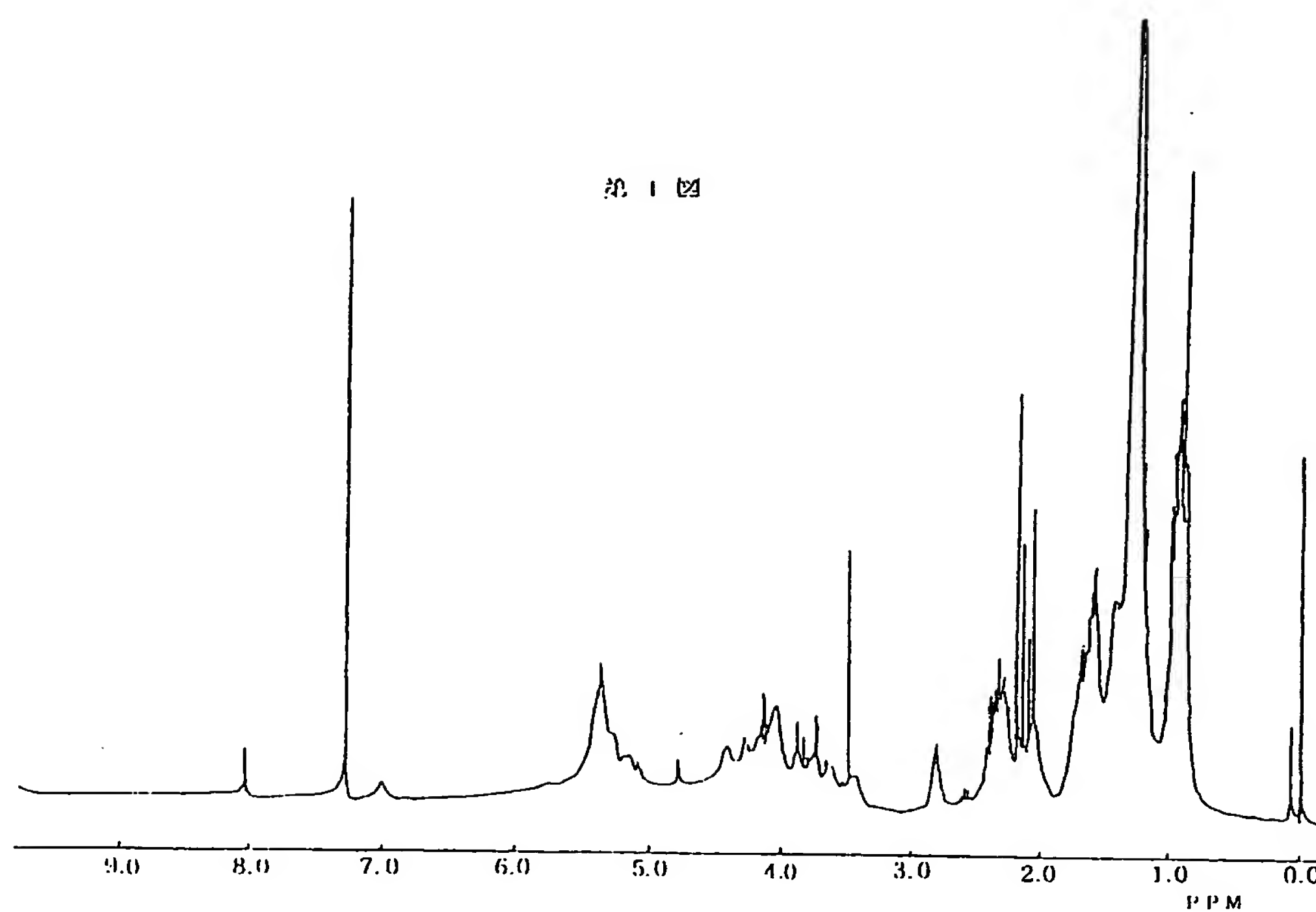
以上

出願人 明治乳業株式会社

代理人 弁理士 有賀三幸

弁理士 高野登志雄

弁理士 小野信夫



**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ **BLACK BORDERS**
- ☐ **IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES**
- ☒ **FADED TEXT OR DRAWING**
- ☒ **BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING**
- ☐ **SKEWED/SLANTED IMAGES**
- ☐ **COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS**
- ☐ **GRAY SCALE DOCUMENTS**
- ☒ **LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT**
- ☒ **REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY**
- ☐ **OTHER:** _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.